



**ATO-DLO**

## CA-bewaring asperges 1992

Rapport

**VERTROUWELIJK**

**Agrotechnologisch  
Onderzoek Instituut  
(ATO-DLO)**  
Haagsteeg 6  
Postbus 17  
6700 AA Wageningen  
tel. 08370 - 75000  
fax. 08370 - 12260

Drs. S.P. Schouten

Eigendom van ATO-DLO. Niets uit dit rapport mag worden gebruikt, vermeerderd of gedistribueerd zonder schriftelijke toestemming van ATO-DLO.

1958824

---

## Inhoudsopgave

## Pagina

Samenvatting	3
1. Inleiding	4 - 5
2. Materialen en Methoden	6 - 7
2.1 Produkt	6
2.2 Inzet	6
2.3 Opslag	6
2.4 Bepalingen	7
2.5 Tijdschema	7
3. Resultaten	8 - 13
3.1 Gewichtsverlies	8
3.2 Bruinverkleuring	9 - 10
3.3 Rot	10 - 11
3.4 Koprot	11 - 12
3.5 Rood	12 - 13
3.6 Vezelgehalte	13 - 14
3.7 Vezeligheid	14 - 15
3.8 Ademhaling	15 - 16
3.9 Ethyleenproduktie	16 - 17
3.10 Ethanolgehalte	17 - 18
4. Discussie	19 - 20
5. Literatuur	21
Bijlagen	

## **Samenvatting**

In de zomer van 1992 werd bewaaronderzoek met asperges uitgevoerd. Doel was na te gaan in hoeverre seizoensverlenging voor dit produkt is te realiseren met behulp van CA-condities en welke deze condities dan moeten zijn. Vers geoogste asperges van twee bedrijven werden opgeslagen in een doorstroom systeem bij 0-1°C. In de bewaareenheden werden 6 verschillende luchtsamenstellingen gerealiseerd, variërend in zuurstof tussen 21, 2 en 1% en in koolzuur tussen 0 en 20%. De asperges werden na 30 en 49 dagen beoordeeld. Parameters waren een aantal visuele kenmerken: bruin- en roodverkleuring, parasitair bederf. Verder werden vastgesteld de ademhalingsactiviteit, ethyleenproduktie en het ethanolgehalte, terwijl de hoeveelheid vezels werd bepaald alsmede de sensorische vezeligheid.

Verhoging van het koolzuurgehalte in de bewaaratmosfeer reduceerde bruinverkleuring, terwijl de ontwikkeling van sensorische vezeligheid sterk werd afgeremd. De ethyleenproduktie werd door koolzuur sterk beperkt, terwijl het ethanolgehalte uitsluitend door 20% koolzuur werd bevorderd. De invloed van een verlaagd zuurstofgehalte was beperkt tot een zeer lichte stimulering van roodverkleuring.

De mogelijkheden tot praktische toepassing liggen meer op het gebied van transport en verpakking dan in seizoensverlenging door middel van relatief langdurige bewaring.

Als advies voor CA-bewaring geldt een verhoging van het koolzuurgehalte tussen de 10 en 20%, terwijl de verlaging van zuurstof beperkt dient te worden.

## 1. Inleiding

Asperges worden in het algemeen niet bewaard, echter zo dit noodzakelijk is wordt een temperatuur van 0-1°C aanbevolen en een zo hoog mogelijke luchtvochtigheid. Onder deze omstandigheden kan het produkt ongeveer 2 weken worden bewaard (1). Volgens buitenlandse gegevens reageert het produkt gunstig op een verhoging in het CO<sub>2</sub> gehalte (2,3,4), terwijl ook recent eigen onderzoek (8) in dezelfde richting wijst. Met verlaging van de zuurstofspanning zou men voorzichtig moeten zijn (2), hoewel eigen onderzoek deze aanwijzing niet oplevert. Er werden geen voordelen van een sterke verlaging van de zuurstofspanning waargenomen (8). Ook in onderzoek op het voormalige Sprenger Instituut werden geen gevaren van de lage zuurstofspanning gezien. Hier werden optimale condities van 3%CO<sub>2</sub> + 5%O<sub>2</sub> genoemd (5). Op beperkte schaal wordt enig gebruik gemaakt van de reactie op CA-condities in het toepassen van folieverpakking of het gebruikmaken van CA-containers. Er zijn met gesloten verpakkingen eveneens gunstige ervaringen opgedaan (6,7). Het kwaliteitsvoordeel uit zich in een geringer vochtverlies, een mindere groei van pathogenen, geringere topopening en ontwikkeling van vezeligheid.

Overschrijding van bepaalde zeer lage grenzen in het zuurstofgehalte uiten zich in vlekken en glazigheid. Ondanks de hoge ademhalingsintensiteit (1) lijkt het produkt zeer lage zuurstofconcentraties te kunnen verdragen, daar oudere literatuur (4) de mogelijkheid van stikstofbewaring niet uitsluit. Hiertegenover staat de waarschuwing, dat zuurstofpercentages onder de 10% schadelijk zouden kunnen zijn (3).

Ook overschrijding van bepaalde CO<sub>2</sub>-spanning geeft afwijkingen. De grens hiervoor lijkt echter boven de 10% te liggen.(2,3,8).

Afzetomstandigheden kunnen in de praktijk in principe worden verbeterd. Te denken valt hierbij aan betere opslag-, verpakkings- en transportcondities. Op dit moment is de zorg voor de houdbaarheid in Nederland beperkt tot het conditioneren op veiligheden. Benutting van verdere mogelijkheden zouden kunnen leiden tot verlenging van de afzetperiode van asperges. Teneinde te weten te komen of CA-condities als aanvulling op koeling verdere houdbaarheidsverbetering geeft, werd door ATO-DLO onderzoek verricht in 1991. De voornaamste conclusie uit dat onderzoek was, dat CA-condities meer moeten worden beschouwd als middel tot een beter kwaliteitsbe-

houd, door middel van adequate transport- en verpakkingstechnieken gedurende de afzet, dan in een verlenging van de afzetperiode door opslag onder CA-condities (8). In dit rapport wordt verslag gedaan van de proefnemingen in 1992, die voor een deel een herhaling inhouden van het onderzoek in de zomer van 1991.

---

## 2. Materiaal en methoden

### 2.1 Produkt

Van de veiling C.V.V. te Grubbenvorst werd het produkt verkregen. Het betrof twee partijen, afkomstig van twee bedrijven onder de aanvoernummers 68729 (Herkomst 1) en 70023 (Herkomst 2). Beide waren van Klasse I in de sortering 20-28. Het produkt was aangevoerd op 23 juni 1992 en werd op dezelfde dag gekoeld op het ATO en in containers gelegd van het doorstroomsysteem. Het product werd gelijkmatig verdeeld over de objecten.

### 2.2 Inzet

De asperges werden in 48 porties verdeeld van ongeveer 500-800 gram. Per bewaarcontainer werden 4 porties (steeds 2 van elke herkomst) in een bakje naast elkaar gelegd. Door plastic folie tussen de porties te plaatsen, werd voorkomen dat fysiek contact mogelijk werd. Na alle porties te hebben gewogen, werden ze in de bewaarcontainers geplaatst. De monsters omvatten 8 en 12 stengels. De 8 stengels waren afkomstig van Herkomst 1 en de 12 van 2.

### 2.3 Opslag

Het produkt werd bewaard bij de volgende condities in doorstroomcontainers van 70 liter groot. Bewaarcondities werden ingesteld op:

- temperatuur: 0-1°C
- luchtsamenstellingen:
  - 0%CO<sub>2</sub> - 21%O<sub>2</sub>
  - 5%CO<sub>2</sub> - 21%O<sub>2</sub>
  - 10%CO<sub>2</sub> - 21%O<sub>2</sub>
  - 20%CO<sub>2</sub> - 21%O<sub>2</sub>
  - 0%CO<sub>2</sub> - 1%O<sub>2</sub>
  - 0%CO<sub>2</sub> - 2%O<sub>2</sub>
- bewaarduur 30 (tot 22 juli 1992) en 49 (10 augustus 1992) dagen.

## 2.4 Bepalingen

Na de genoemde perioden werden monsters uit de doorstroomcontainers beoordeeld. Per container werd per uitslag steeds 1 monster per herkomst genomen. 5 stengels van elk monster werden direct in zakjes verpakt en bij -25°C in een diepvriezer geplaatst voor latere bepalingen. De monsters werden beoordeeld op:

- gewichtsverlies: alle porties werden voor inslag en bij uitslag gewogen.
- bruinverkleuring: hiertoe werden alle stengels van een monster beoordeeld (visueel) op "geen", "licht", "matig" of "sterk" verkleurd. Deze categorieën kregen respectievelijk een 0, 1, 2 en 3.
- roodverkleuring: idem uitgedroogd bruinverkleuring.
- koprot: idem bruinverkleuring, echter niet in klassen, maar als wel/niet aanwezig.
- vezelgehalte: hiertoe werden stengels opgeslagen bij -25°C waarin later het vezelgehalte werd bepaald. Hiervoor werden monsters met het enzymmengsel "Rapidase" geïncubeerd, waarna de overgebleven sklerenchymatische weefsels werden gefiltreerd en gedroogd. Zie verder bijlage 1. Als aanvulling op deze bepaling werd ook sensorisch onderzoek verricht.

Een paarsgewijze vergelijking werd uitgevoerd op asperges uit de bewaarcondities met verhoogd koolzuur.

De gegevens werden met variantie analyse op aantoonbare effecten geanalyseerd.

- ademhaling en ethyleenproductie: ongeveer een week en na 4 weken na aanvang van het onderzoek werden de ademhaling en ethyleenproductie gemeten d.m.v. ophoping van koolzuur en ethyleen in de doorstroomcontainers. CO<sub>2</sub> werd gemeten met een infrarood CO<sub>2</sub>-meter. Een te meten luchtmonster werd ingespoten in een continue N<sub>2</sub>-stroom door de CO<sub>2</sub>-analysator. Het bleek echter alleen mogelijk de CO<sub>2</sub>-productie te meten in de containers met een relatief laag CO<sub>2</sub>-gehalte. C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> werd gaschromatografisch (Chrompack) bepaald.
- ethanolgehalte: na de eerste uitslag werden monsters produkt bij -25°C ingevroren en later werd langs enzymatische weg (zie bijlage 2) het ethanolgehalte bepaald.

## 2.5 Tijdschema

Inzet: 23-06-1992  
Uitslag 1: 22-07-1992  
Uitslag 2: 10-08-1992

### 3. Resultaten

#### 3.1 Gewichtsverlies

In de bijlage 3 zijn de gedetailleerde gegevens opgenomen van de gewichtsverliezen. Hierbij valt op, dat tijdens de eerste opslagperiode het verlies beperkt blijft tot 1 tot 3%, terwijl tijdens de tweede periode het verlies vrij sterk toeneemt. In Tabel 1 zijn de gemiddelden per bewaarconditie en per herkomst weergegeven.

**Tabel 1:** Invloed van de luchtsamenstelling op het gewichtsverlies bij asperges na verschillende bewaartijden.

Bewaar- conditie	Gewichtsverlies (%)* na:			
	Herkomst 1	Herkomst 2		
		49	30	
	30 dagen	49 dagen	30 dagen	49 dagen
0 - 21	1.43	4.64	2.79	5.41
5 - 21	1.36	4.09	0.67	4.15
10 - 21	1.21	3.51	0.51	4.14
20 - 21	1.61	3.35	0.65	3.38
0 - 1	0.99	3.71	0.80	3.30
0 - 2	1.02	3.34	0.80	3.9

Uit de variantie analyses gedraaid per uitslag bleek geen aantoonbaar effect aanwezig. Toch lijkt enige invloed op gewichtsverlies aanwezig. De in lucht bewaarde stengels blijken consequent het hoogste, terwijl bij oplopende CO<sub>2</sub> er een afname aanwezig lijkt te zijn. Aantoonbaar is dit effect (p<5%) echter net niet.

Analyse van de volledige set gegevens leverde een significant verschil op tussen de uitslagen. Het gemiddelde gewichtsverlies na 30 dagen bedroeg 1.15% en het verlies na 49 dagen was 3.92%. Verder bleken de CA-condities te verschillen van in lucht bewaarde asperges. Een andere verklaring dan de iets betere kwaliteit van asperges bewaard onder koolzuur is niet voorhanden.



3.2 Bruinverkleuring

De gegevens zijn in de bijlage 3 weergegeven, terwijl de samenvatting van de gemiddelden in tabel 2 en 3 worden vermeld.

**Tabel 2:** Invloed van de luchtsamenstelling op de bruinverkleuring\* van asperges na 30 dagen opslag bij 0-1°C.

Bewaarconditie %CO <sub>2</sub> - %O <sub>2</sub>	Herkomst 1	Herkomst 2	Gemiddeld
0 - 21	1.875	1.417	1.646 d
5 - 21	1.000	0.458	0.729 ab
10- 21	0.500	0.417	0.458 ab
20- 21	0.375	0.167	0.271 a
0 - 1	1.500	1.792	1.646 d
0 - 2	1.563	1.083	1.323 cd

\* = gemiddelden voor dezelfde letter zijn niet significant (p<5%). Vergelijkingen alleen in de kolommen.

Na 30 dagen bewaring was van een aanzienlijke bruinverkleuring sprake. Statistisch betrouwbare effecten zijn er alleen van de CA-conditie, niet van de herkomst, terwijl ook geen interactie kon worden aangetoond. In de laatste kolom van tabel 2 is aangegeven, dat de bruinverkleuring wordt geremd door de aanwezigheid van koolzuur en wel sterker naarmate de koolzuurspanning hoger is. De lage zuurstof-behandelingen onderscheiden zich niet van de in lucht bewaarde asperges.

**Tabel 3:** Invloed van de luchtsamenstelling op bruin verkleuring van asperges na 49 dagen opslag bij 0-1°C.

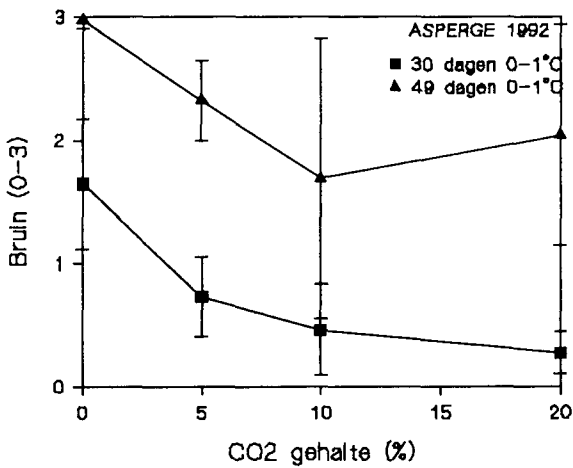
Bewaarconditie %CO <sub>2</sub> + %O <sub>2</sub>	Herkomst 1	Herkomst 2
0 - 21	2.94	3.00
5 - 21	2.19	2.46
10- 21	1.25	2.12
20- 21	2.12	1.96
0 - 1	3.00	3.00
0 - 2	3.00	3.00

Er konden geen effecten worden aangetoond, noch van de CA-conditie noch van de herkomst, terwijl de invloed van de interactie ook afwezig bleek. Mogelijk is dit tot op zekere hoogte veroorzaakt door de zeer langdurige bewaring. Dit had tot gevolg, dat de stengels zeer sterke bruinverkleuring vertoonden bij uitslag. Hierdoor vallen teveel exemplaren in de hoogste bruin klasse, hetgeen mogelijk onderscheid dan maskeert.

Bij de oplopende reeks koolzuur lijkt een daling in de bruinverkleuring voorhanden. Dit is het geval bij beide herkomsten. Het effect is echter niet aantoonbaar (p<5%).

Als totaal kan worden geconcludeerd, dat verhoging van koolzuur gunstig werkt op de reductie van bruin verkleuring. Verlaging van de zuurstofspanning vertoont dit beeld niet.

In figuur 1 zijn de invloeden op de twee uitslagtijdstippen weergegeven.



**Fig 1:** Invloed van de koolzuurconcentratie op bruinverkleuring van asperges na verschillende opslagduur bij 0-1°C.

**3.3 Rot**

Deze bepaling betreft beoordelingen op rot anders dan koprot. De waarnemingen zijn samengevat in bijlage 3 en de gemiddelden staan in tabel 4.

**Tabel 4:** Invloed van CA-condities op de ontwikkeling van rot op asperges na 30 en 49 dagen bewaring bij 0-1°C.

Bewaarconditie %CO <sub>2</sub> + %O <sub>2</sub>	Herkomst 1		Herkomst 2	
	30 dagen	49 dagen	30 dagen	49 dagen
0 + 21	0.00	3.00	0.13	2.79
5 + 21	0.00	2.56	0.08	2.58
10 + 21	0.00	2.37	0.00	2.67
20 + 21	0.00	2.31	0.00	3.00
0 + 1	0.00	2.75	0.92	3.00
0 + 2	0.00	2.69	0.00	2.96

Het voorkomen van rot kwam tot 30 dagen bewaring alleen en dan nog in geringe mate, in herkomst 2 voor. Na de langste bewaarduur kwam echter zeer veel rot voor. Verreweg de meeste stengels moesten als "in ernstige mate rot" worden gekwalificeerd. Statistische analyse op dit kenmerk leverde geen aantoonbare verschillen, noch na 30 dagen noch na 49 dagen. Ook interacties tussen de herkomst en de bewaarconditie konden niet worden aangetoond ( $p < 5\%$ ). Er lijkt alleen een zekere afname in rot te constateren met het toenemen van de CO<sub>2</sub>-concentratie na 30 dagen bewaarduur, maar zoals gezegd betreft dit geen statistisch betrouwbaar verschil. Verder is ook na 49 dagen bewaarduur dit effect niet te zien.

Verlaging van de zuurstofspanning heeft evenmin een effect.

Een mogelijk bezwaar van de langste bewaarduur kan zijn, dat de rotontwikkeling reeds te ver was gevorderd. Hierdoor vallen teveel exemplaren in de categorie 3 en worden mogelijk verschillen in de ernst van de rotontwikkeling wat gemaskeerd.

### 3.4 Koprot

Koprotbepalingen werden alleen verricht na 49 dagen opslag, daar bij de kortste bewaarperiode het probleem niet werd aangetroffen. De gegevens zijn vermeld in de bijlage 3, terwijl samenvattingen in de tabel 5 zijn weergegeven.

**Tabel 5:** Invloed van de luchtsamenstelling op het %koprot bij 2 herkomsten asperges na 49 dagen bij 0-1°C.

Bewaarconditie %CO <sub>2</sub> - %O <sub>2</sub>	Herkomst 1		Herkomst 2	
0 - 21	56.2		58.3	
5 - 21	31.3		25.0	
10- 21	37.5		45.8	
20- 21	68.8		54.2	
0 - 1	56.2		50.0	
0 - 2	62.5		54.2	

Herkomst noch bewaarconditie bleken significant, terwijl ook geen interactie tussen deze factoren kon worden aangetoond. Verlaging van zuurstof noch verhoging van koolzuur bleken in de statistische analyse significant.

**3.5 Rood**

De gegevens omtrent de beoordelingen zijn opgenomen in de bijlage 3. In Tabel 6 wordt een overzicht van de gemiddelden gegeven.

**Tabel 6:** Invloed van CA-condities en herkomst op roodverkleuring\* bij asperges na verschillende bewaartijden bij 0-1°C.

Bewaar- condities	Herkomst 1		Herkomst 2		Gem
	30 dagen	49 dagen	30 dagen	49 dagen	
%CO <sub>2</sub> - %O <sub>2</sub>					
0 - 21	0.06	0.31	0.63	0.92	0.48 ab
5 - 21	0.19	0.00	0.29	0.25	0.18 b
10- 21	0.00	0.00	0.25	0.00	0.06 b
20- 21	0.13	0.00	0.21	0.21	0.14 b
0 - 1	0.88	1.00	0.42	1.08	0.84 a
0 - 2	0.75	1.31	0.79	1.67	1.13 a

\* gemiddelden voor eenzelfde letter zijn niet significant verschillend (p<5%).

Statistische analyse van dit cijfermateriaal leverde wederom geen significante verschillen, noch voor de herkomst, noch voor de CA-conditie. Bijna aantoonbaar was de invloed van de CA-conditie op roodverkleuring na 49 dagen. In dit geval was er een uiterst zwakke tendens, die inhield, dat met stijging van het koolzuurgehalte de verkleuring minder leek. De invloed van zuurstofverlaging bleek ook niet aantoonbaar ( $p < 5\%$ ).

Analyse van de gezamenlijke gegevens van de twee uitslagen leverde een aantoonbaar verschil op tussen de lage zuurstofgehalten en de hoge koolzuur behandelingen. Koolzuur vermindert de gemiddelde roodverkleuring en laag zuurstof lijkt dit verschijnsel te versterken.

### **3.6 Vezelgehalte**

In de bijlage 3 zijn de gegevens omtrent het vezelgehalte opgenomen. In tabel 7 is de invloed van de CA-condities op deze parameter weergegeven. De bepalingen werden alleen uitgevoerd na 30 dagen bewaring bij 0-1°C.

**Tabel 7:** Invloed van CA-condities op het vezelgehalte van asperges bewaard gedurende 30 dagen bij 0-1°C.

Bewaarcondities %CO <sub>2</sub> - %O <sub>2</sub>	Herkomst 1	Herkomst 2
0 - 21	0.24	0.22
5 - 21	0.27	0.18
10- 21	0.14	0.16
20- 21	0.18	0.16
0 - 1	0.26	0.27
0 - 2	0.29	0.31

Uit de variantie analyses kwamen net geen significante invloeden naar voren. Toch lijkt er met name uit de dalende vezelgehalten bij oplopende koolzuurconcentraties een effect op de vezels aanwezig te zijn. Duidelijk is verder, dat de verlaging van het zuurstofgehalte geen bijdrage levert aan vermindering van het vezelgehalte.

**3.7 Vezeligheid**

Als aanvulling op het bovenstaande werd een paarsgewijze vergelijking uitgevoerd tussen 0 en 10%CO<sub>2</sub>, tussen 0 en 20%CO<sub>2</sub>, tussen 5 en 10%CO<sub>2</sub> en tenslotte tussen 5 en 20% koolzuur. Per conditie werden 4 onder- en 4 bovenstukken van elk 7 cm in de test per conditie gebruikt. De asperges werden voor de test geschild. In tabel 8 zijn de resultaten van deze testen weergegeven.

**Tabel 8:** Invloed van de bewaarconditie op sensorische vezeligheid van asperges.

Conditie	Voorkeursverhouding
0%CO <sub>2</sub> vs 10%CO <sub>2</sub>	16 maal voor 0%CO <sub>2</sub> en geen voor 10%CO <sub>2</sub>
0%CO <sub>2</sub> vs 20%CO <sub>2</sub>	15 maal voor 0%CO <sub>2</sub> en 1 maal voor 20%CO <sub>2</sub>
5%CO <sub>2</sub> vs 10%CO <sub>2</sub>	13 maal voor 5%CO <sub>2</sub> en 3 maal voor 10%CO <sub>2</sub>
5%CO <sub>2</sub> vs 20%CO <sub>2</sub>	13 maal voor 5%CO <sub>2</sub> en 3 maal voor 20%CO <sub>2</sub>

In alle tests was steeds de hogere concentratie koolzuur significant beter dan de lagere concentratie. Koolzuurverhoging tijdens bewaring draagt dus in hoge mate bij tot het behoud van kwaliteit in termen van het behoud van malsheid van de stengels. De verklaring voor het grote verschil tussen vezelgehalte en (sensorische) vezeligheid moet worden gezocht in het volgende. Het vezelgehalte wordt hoofdzakelijk bepaald door een ring van vaatbundels vlak onder de schil. Deze vaatbundeling wordt met schillen verwijderd.

**3.8 Ademhaling**

De resultaten van de twee metingen naar de ademhalingsactiviteit zijn in tabel 9 samengevat.

**Tabel 9:** Invloed van de bewaarconditie op de ademhalingactiviteit van asperges bij 0-1°C.

Bewaarconditie CO <sub>2</sub> produktie (mg.kg.uur)				
%CO <sub>2</sub> + %O <sub>2</sub>	1 w	Gem	4 w	Gem.
0 + 21	24.7	23.69	37.7	33.32
	22.8		27.6	
0 + 2	22.5	22.04	32.2	30.98
	21.6		29.8	
0 + 1	18.2	20.28	24.1	27.92
	22.4		31.8	

Alleen de metingen in de genoemde condities waren betrouwbaar en zijn vermeld. Er blijkt een zeer geringe remming van de ademhalingsactiviteit zich voor te doen bij verlaging van de zuurstofspanning. Het geringe verschil dat tussen lucht en verlaagd zuurstof aanwezig blijkt, komt overeen met de afwezigheid van positieve invloed op het behoud van kwaliteit genoemd onder voorgaande hoofdstukjes.

### 3.9 Ethyleenproduktie

In tabel 10 en figuur 2 zijn de resultaten van de metingen weergegeven.

**Tabel 10:** Invloed van CA-condities op ethyleenproduktie\* van asperges na 1 en 4 weken opslag bij 0-1°C.

Bewaarconditie Ethyleenproduktie		
%CO <sub>2</sub> + %O <sub>2</sub>	1week	4weken
0 + 21	0.079 a	0.941 d
5 + 21	0.018 a	0.171 b
10 + 21	0.005 a	0.014 a
20 + 21	0.001 a	0.001 a
0 + 1	0.043 a	0.526 c
0 + 2	0.038 a	0.613 c

\* getallen voorzien van eenzelfde letter zijn niet significant verschillend (p<5%).



Bij de beoordeling van de ethyleenproductie moeten enkele punten in acht worden genomen. Op de eerste plaats is de productie gemeten van een mengsel van twee herkomsten. Verder wordt vrijwel zeker het algemeen hogere niveau na 4 weken voor een deel ook veroorzaakt door zich ontwikkelende rotverschijnselen, zie tabel 4. Hierin is sprake van enkele lichte aantastingen in 0%CO<sub>2</sub> + 21%O<sub>2</sub> en in 5%CO<sub>2</sub> + 21%O<sub>2</sub>. Deze kunnen echter zorgen voor een flinke toename in ethyleenproductie. Deze beperking laat echter onverlet, dat het beeld na een week hetzelfde is als na 4 weken. De hoogste productie wordt vastgesteld in lucht, terwijl in toenemende mate remming optreedt in hogere concentraties koolzuur, zie figuur 2.

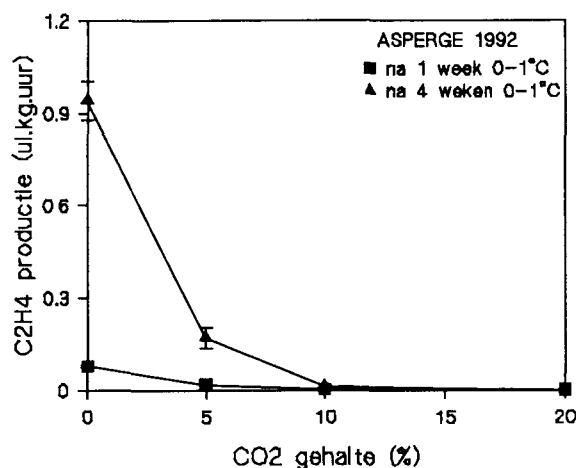


Fig 2: Invloed van de koolzuurconcentratie op de ethyleenproductie van asperges bij 0-1°C.

Variantie analyse van de totale gegevens van de bepalingen na 1 en 4 weken toonde aan, dat de invloed van de CA-conditie, de bewaarduur en hun interactie aantoonbaar was.

Opmerkelijk is dus, dat met een toename van de koolzuurspanning de ethyleenproductie steeds verder wordt onderdrukt. Ook de verlaging van de zuurstofspanning reduceert de ethyleenproductie aantoonbaar ten opzichte van de bewaring in lucht, zij het niet zo volledig als door hoog koolzuur.

### 3.10 Ethanolgehalte

In monsters van de eerste uitslag werd het ethanolgehalte bepaald. De uitkomsten van dit onderzoek zijn in tabel 11 weergegeven.

**Tabel 11:** Invloed van de bewaarconditie op de ontwikkeling van ethanol in asperges bewaard bij 0-1°C.

Bewaarconditie %CO <sub>2</sub> + %O <sub>2</sub>	Ethanolgehalte (mg.100g)
0 + 21	0.5
5 + 21	0.5
10 + 21	0.0
20 + 21	72.0
0 + 1	1.5
0 + 2	0.5

De gehalten in alle condities, met uitzondering van 20%CO<sub>2</sub> +21%O<sub>2</sub> blijken zeer laag. Bij 20%CO<sub>2</sub> blijkt ethanol zich enigszins op te hopen. Dit hoeft op zichzelf geen verontrustend verschijnsel te zijn, maar het vormt hoe dan ook een aanwijzing, dat het normale ademhalingspatroon in het gedrang is gekomen en er sprake is van gisting.

## 4. Discussie

De in de literatuur (2,3,4,8) vermelde effecten van CA-condities op de kwaliteit van asperges konden in dit onderzoek opnieuw worden bevestigd. Het effect van koolzuurverhoging op de bruinverkleuring was significant, terwijl het effect op parasitair bederf en het vezelgehalte in dit onderzoek erg zwak was. Een weliswaar niet sterke aanwijzing voor schadelijkheid van laag zuurstof werd eveneens gevonden, met name voor roodverkleuring. Voordelen van een laag zuurstof t.a.v. van koprot konden nu niet worden aangetoond i.t.t. voorgaand onderzoek (8). Geconcludeerd moet worden, dat de voordelen van CA-condities bij asperges beperkt zijn tot koolzuurverhoging, daar koprot ook door koolzuurverhoging wordt tegengegaan.

In dit onderzoek werd een zeer sterk positieve invloed van koolzuurverhoging op de sensorische vezeligheid vastgesteld. Het verschil tussen het totaal vezelgehalte en de sensorische vezeligheid moet worden gezocht in de vaatbundelring dicht onder de schil. Dit materiaal wordt voor de sensorische toets uiteraard verwijderd. Het is niet duidelijk hoe hoog koolzuur inwerkt op de sensorische vezeligheid. Het effect van koolzuur op deze eigenschap is echter voor de praktijk van groot belang, daar vezeligheid een bij uitstek negatieve eigenschap is van asperges.

In dit onderzoek werden tenslotte aanwijzingen gevonden voor de mogelijke schadelijkheid van 20% koolzuur. Er werd een toename in ethanolgehalte vastgesteld, hetgeen duidelijk maakt dat het weefsel niet meer normaal ademhaalt. Koolzuurverhoging is dus gunstig te noemen voor de houdbaarheid van asperges. De concentratie moet echter beneden de 20% blijven.

In het voorgaande rapport (8) werd de volgende vraag gesteld: is het mogelijk tot een verlenging van de afzetperiode te komen door toepassing van CA-condities als aanvulling op koeling? Volledigheidshalve wordt hier het antwoord op deze vraag herhaald met aanvulling van de gegevens uit dit onderzoek.

De bewaring van asperges heeft alleen zin wanneer dit wordt gedaan na afloop van het seizoen. Tijdens het seizoen heeft opslag geen zin, doordat voortdurend verse asperges worden aangeboden. De mogelijkheden van bewaring zijn beperkt. Met koeling kan maximaal 2 weken worden bewaard (1). Uit het voorgaande onderzoek (8) bleek echter reeds na 19 dagen plus een nabewaarperiode van 3 dagen bij 15°C

een aanzienlijke bruinverkleuring van de asperges. Door koolzuurverhoging wordt dit afgeremd, echter zeker niet volledig. Tevens is er na 19+3 dagen reeds sprake van een begin van schimmelgroei, die eveneens door koolzuurverhoging werd beperkt. Dit onderzoek bevestigde de uitkomsten van het eerste onderzoek en verder bleek, dat de sensorische vezeligheid door koolzuur sterk werd tegengegaan.

Samengevat kan worden gesteld, dat door toepassing van verhoogde koolzuurgehalten het produkt in een betere conditie blijft. Zo men dit wil vertalen in een langere (t.o.v. koeling) bewaarduur, dan zijn hiertoe de mogelijkheden zodanig beperkt, dat investeringen alleen voor de opslag van asperges niet verantwoord lijken. Bedacht moet verder worden, dat na bewaring de asperges met gebreken moeten worden verwijderd. In een verpakkingseenheid mogen geen verkleurde of door schimmelgroei aangetaste exemplaren voorkomen. Zo verwijdering al mogelijk is, dan zal dit met flinke kosten (produktverlies en werk) gepaard gaan.

CA-bewaring aan het einde van het aspergeseizoen lijkt dus zeer beperkt. Er zijn echter ook andere toepassingsmogelijkheden. De kwaliteit van het produkt is in een koolzuur rijke omgeving beter gegarandeerd dan in lucht. Hiervan kan worden gebruik gemaakt op twee manieren. Op de eerste plaats kan worden gedacht aan toepassing van deze techniek bij (langdurige) transporten. Door het afremmen van verkleuringen en parasitair bederf worden risico's van kwaliteitsproblemen vermindert.

Op de tweede plaats kan worden gepleit voor toepassing van gasdichte folies, die in staat zijn de koolzuurspanning aanzienlijk te verhogen. Ook in dit geval zal de kans op verkleuring en bederf minder zijn. Verder is nu duidelijk geworden, dat de sensorische kwaliteit beter wordt behouden door het afremmen van vezeligheid.

De conclusie uit dit onderzoek is opnieuw, dat koolzuurverhoging kwaliteitsverlies van asperges tegengaat. Toepassing van dit gegeven moet meer gezocht worden in verpakking en transport dan in een verlenging van de afzetperiode.

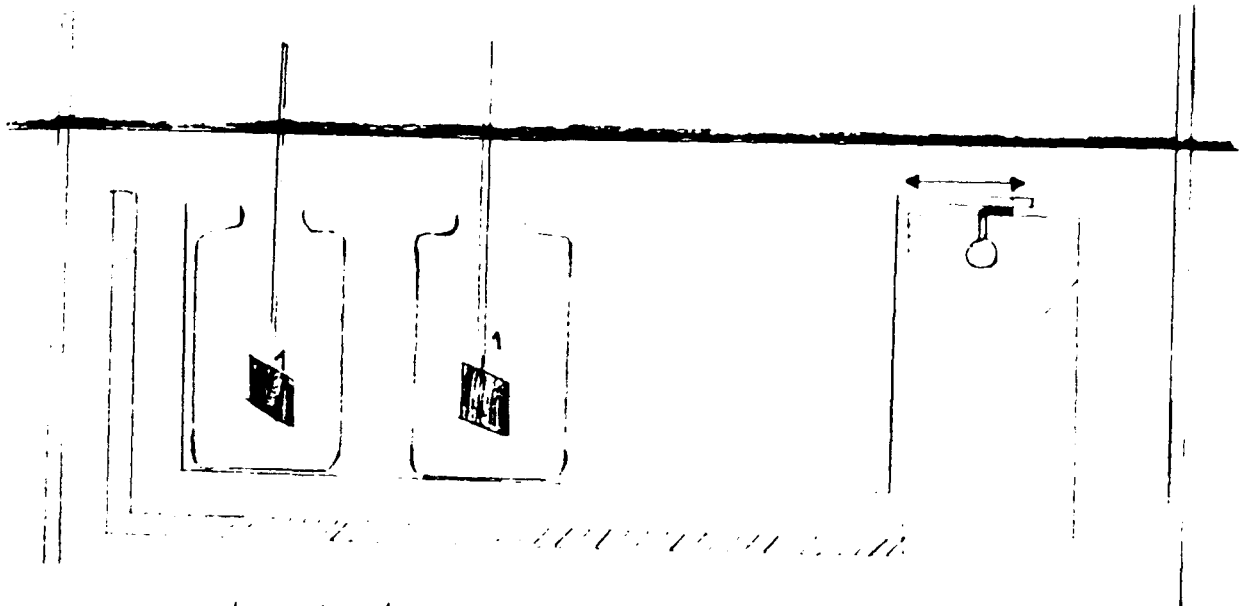
Als advies voor toepassing van CA-condities geldt: Koolzuurverhoging tussen 10 en 20%, terwijl zuurstofverlaging achterwege kan blijven.

## 5. Literatuur

1. Anon Produktgegevens Groente en Fruit. Mededeling Nr. 30 Sprenger Instituut Wageningen. ASPERGE
2. Saltveit M.E. Jr. A summary of requirements and recommendations for the controlled and modified atmosphere storage of harvested vegetables.  
In: Int. Contr. Atm. Res. Conf. 5th Proc. Vol 2, Other Commodities and Storage Recommendations, 329-352 (1989).
3. Lipton W.J. Post-Harvest Responses of Asparagus Spears to High Carbon Dioxide and Low Oxygen Atmospheres. Proc. A. Soc. Hort. Sci. 86, 347-356 (1965).
4. Loughheed E.C. and D.H. Dewey. Factors affecting the Tenderizing Effect of Modified Atmospheres on Asparagus Spears During Storage Proc. A. Soc. Hort. Sci. 89, 336-345 (1966).
5. Stenvers N. en P. Herchel. CA-bewaring van groente en zacht fruit. Rapport Nr. 1750 Sprenger Instituut Wageningen (1971).
6. Sonneveld-van Buchem H. Kleinverpakking van asperges. Rapport Nr. 2318 Sprenger Instituut, Wageningen (1985).
7. Tomkins R.B. and B.A. Cumming Effect of Pre-Packaging on Asparagus Quality after Simulated Transportation and Marketing. Scientia Hort. 36, 25-35 (1988).
8. Schouten S.P. CA-bewaring asperges 1991. ATO-DLO Rapport No 395 (1993).

## Bylage 1

- De asperges in stukken van ca. twee cm. snijden; bij ongeschilde asperges de dikkere in de lengte nog eens in vier delen. Vervolgens de stukken in 720 ml. potten doen.
- Aspergesstukken met 200 ml. water gedurende 2 uur koken. Hierna afgieten en de asperges afzeven over een draadzeef van 0,25 mm. en de tegen gehouden deeltjes terug doen in de pot.
- De 720 ml. potten vullen met citraat bufferoplossing pH 3,75 (7,5 gram tri-Na-citraat per liter, op pH 3,75 gebracht met 4 n HCl), tot ca. 600 ml. totale inhoud.
- Toevoegen 1,0 gram rapidase C-600 (fabrikant Gist-Brocades) per pot: dit komt overeen met ca. 0,3 à 0,4%, berekend op het vers produkt.
- Filterpapier uitspoelen en 16 uur drogen in een droogstoof bij 70°C.
- Potten in een schudbad met een constante temperatuur van 45°C plaatsen. (zie figuur 5).
- Na 20 uur schudden, de inhoud van de potten uitgieten op draadzeef van 0,25 mm..
- Met een krachtige platte waterstraal de losse cellen door de zeef spuiten. Vooral de zogenaamde klusters en vezels in dunne laag goed bespuiten tot er geen visuele verandering meer optreedt.
- Vezels overbrengen op getarreeerd (en gespoeld en gedroogd) filterpapier. Schildelen kunnen op een apart filterpapier gebracht worden.
- Deze vezels en schildelen gedurende 16-20 uur drogen in een droogstoof bij 70°C en daarna terugwegen.
- Bereken droge vezelgehalte ten opzichte van gewicht verse produkt.



doorsnede schudbad: Potten met bewegende koker schudden  
de kokers en liques still staan

# Ethanol

## UV-method

for the determination of ethanol in foodstuffs and other materials

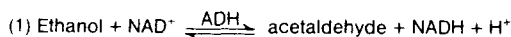
Simplified procedure for the determination of ethanol in alcoholic beverages see pt. 1.2.

Cat. No. 176 290

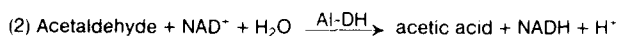
Test-Combination for ca. 30 determinations

### Principle (Ref. 1,2)

Ethanol is oxidized to acetaldehyde in the presence of the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) by nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD). (1).



The equilibrium of this reaction lies on the side of ethanol and NAD. It can, however, be completely displaced to the right at alkaline conditions and by trapping of the acetaldehyde formed. Acetaldehyde is oxidized in the presence of aldehyde dehydrogenase (Al-DH) quantitatively to acetic acid (2).



NADH is determined by means of its absorbance at 334, 340 or 365 nm.

### The Test-Combination contains

1. Bottle 1 with approx. 100 ml solution, consisting of: potassium diphosphate buffer, pH 9.0; stabilizers.
2. Bottle 2 with approx. 30 tablets, each tablet contains: NAD, approx. 4 mg; aldehyde dehydrogenase, 0.8 U; stabilizers.
3. Bottle 3 with approx. 1.6 ml enzyme suspension, consisting of: ADH, 7000 U; stabilizers.
4. Ethanol standard solution.

### Preparation of solutions

1. Use contents of bottle 1 undiluted.
2. Dissolve **one** tablet of bottle 2 with **3 ml** solution of bottle 1 in a beaker or in a centrifuge tube for each assay (blank or samples) depending on the number of determinations. Use forceps for taking the tablets out of bottle 2. This results in reaction mixture 2\*.
3. Use contents of bottle 3 undiluted.

### Stability of solutions

Solution 1 is stable for one year at +4°C.  
Bring solution 1 to 20–25°C before use.  
Reaction mixture 2 is stable for one day at +4°C.  
Bring reaction mixture 2 to 20–25°C before use.  
Contents of bottle 3 are stable for one year at +4°C.

### Procedure

Wavelength<sup>1</sup>: 340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm  
Glass cuvette<sup>2</sup>: 1 cm light path  
Temperature: 20–25°C  
Final volume: 3.15 ml  
Read against air (without a cuvette in the light path), against water or against blank<sup>3</sup>.  
Sample solution: 0.5–12 µg ethanol/cuvette<sup>4</sup> (in 0.1–0.5 ml sample volume)

- 1 The absorption maximum of NADH is at 340 nm. On spectrophotometers, measurements are taken at the absorption maximum; when spectralline photometers equipped with a mercury vapour lamp are used, measurements are taken at a wavelength of 365 nm or 334 nm.
- 2 If desired, disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes.
- 3 For example, when using a double-beam photometer.
- 4 See instructions for performance of the assay.

Not for use in *in vitro* diagnostic procedures for clinical diagnosis



## biochemical analysis food analysis

Recommendations to methods and standardized procedures see references.

Pipette into cuvettes	blank	sample
reaction mixture 2*	3.00 ml	3.00 ml
redist. water	0.10 ml	–
sample solution**	–	0.10 ml
mix***, after approx. 3 min read absorbances of the solutions (A <sub>1</sub> ). Start reaction by addition of		
suspension 3	0.05 ml	0.05 ml
mix***, after completion of the reaction (approx. 5–10 min) read absorbances of the solutions immediately one after another (A <sub>2</sub> ).		

It is absolutely necessary to stopper the cuvettes, e.g. with Parafilm<sup>®</sup>, during measurement (see "Instructions for performance of assay").

\* For simplification of the assay performance it is also possible to pipette directly 3 ml of solution 1 into the cuvette. Afterwards add 1 tablet of bottle 2 and dissolve it (for solubilisation crush the tablet with a glass rod, if necessary). Continue as described in the scheme. The volume error of approx. 1% (the increase of volume caused by one tablet/3.15 ml final volume) has to be taken into account in the calculation by multiplication of the result with 1.01.

\*\* Rinse the enzyme pipette or the pipette tip of the piston pipette with sample solution before dispensing the sample solution.

\*\*\* For example, with a plastic spatula or by gentle swirling after closing the cuvette with Parafilm<sup>®</sup> (registered trademark of the American Can Company, Greenwich, Ct., USA).

Determine the absorbance differences (A<sub>2</sub>–A<sub>1</sub>) for both blank and sample. Subtract the absorbance difference of the blank from the absorbance difference of the sample.

$$\Delta A = \Delta A_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{blank}}$$

The absorbance differences measured should as a rule be at least 0.100 absorbance units to achieve sufficiently accurate results (see "Instructions for performance of assay").

### Calculation

According to the general equation for calculating the concentration in reactions in which the amount of NADH formed is stoichiometric with half the amount of substrate:

$$c = \frac{V \times \text{MW}}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}, \text{ where}$$

V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed [g/mol]

d = light path [cm]

ε = absorption coefficient of NADH at:

$$340 \text{ nm} = 6.3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3.4 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6.18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

It follows for ethanol:

$$c = \frac{3.15 \times 46.07}{\epsilon \times 1 \times 0.1 \times 2 \times 1000} \times \Delta A = \frac{0.7256}{\epsilon} \times \Delta A \text{ [g ethanol/l sample solution]}$$

If the sample has been diluted during preparation, the result must be multiplied by the dilution factor F.

When analyzing solid and semi-solid samples which are weighed out for sample preparation, the result is to be calculated from the amount weighed:

$$\text{content}_{\text{ethanol}} = \frac{c_{\text{ethanol}} \text{ [g/l sample solution]}}{c_{\text{sample}} \text{ [g/l sample solution]}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

Instructions for performance of assay

The amount of ethanol present in the cuvette should range between 1 µg and 12 µg (measurement at 365 nm) or 0.5 µg and 6 µg (measurement at 340, 334 nm), respectively. The sample solution must therefore be diluted sufficiently to yield an ethanol concentration between 0.01 and 0.12 g/l or 0.005 and 0.06 g/l, respectively.

Because of the high sensitivity of the method it has to be taken care that ethanol free water is used and it is worked in an ethanol free atmosphere.

Dilution table

estimated amount of ethanol per liter measurements at		dilution with water	dilution factor F
340 or 334 nm	365 nm		
< 0.06 g	< 0.12 g	-	1
0.06-0.6 g	0.12-1.2 g	1 + 9	10
0.6 -6.0 g	1.2 -12 g	1 + 99	100
6.0 -60 g	12 -120 g	1 + 999	1000
> 60 g	> 120 g	1 + 9999	10000

Because of the volatility of ethanol, the dilution of samples should be carried out as follows:

Fill the volumetric flask half with water and pipette the sample with an enzyme test pipette or a piston type pipette under the surface of the water. Fill up to the mark with water and mix.

If the absorbance difference measured (ΔA) is too low (e.g. < 0.100), the sample solution should be prepared anew (weigh out more sample or dilute less strongly) or the sample volume to be pipetted into the cuvette can be increased up to 0.5 ml. The volume of solution 1 or reaction mixture 2, respectively, remains the same (3.00 ml). The volume of water pipetted into the blank cuvette must then be increased so as to obtain the same final volume for the sample and blank in the cuvettes. The new sample volume v and the new final volume (V) must be taken into account in the calculation.

1. Instructions for sample preparation

1.1. Liquid foodstuffs

Use clear, colorless or slightly colored solutions directly or after dilution according to the dilution table for the assay. Filter turbid solutions or clarify with Carrez reagents. Strongly colored solutions, which are used undiluted for the assay because of their low ethanol concentration, are to be decolorized with polyamide or polyvinylpyrrolidone (PVPP). Carbonic acid containing beverages are to be degassed, beverages with low ethanol content should be adjusted to the alkaline pH range. During the whole procedure it is to be taken care that the ethanol is not evaporated. For example, when diluting an ethanol containing sample, it is to be pipetted under the surface of the water.

Examples:

Determination of ethanol in fruit juices

- a) Use clear light juices after neutralization or dilution, depending on the ethanol content, for the assay (see dilution table).
- b) Decolorize intensely colored juices by addition of 2% polyamide or polyvinylpyrrolidone (PVPP) (e.g. 5 ml juice + 100 mg polyamide or PVPP), stir for 2 min (vessel must be stoppered) and filter. Use the mostly clear solution after neutralization for the assay. Decolorization can often be omitted on dilution.
- c) Filter turbid juices and clarify with Carrez-solutions, if necessary: Pipette 10 ml of juice into a 25 ml volumetric flask, add 1.25 ml Carrez-I-solution (3.60 g potassium hexacyanoferrate-II, K<sub>4</sub> [Fe(CN<sub>6</sub>)] · 3 H<sub>2</sub>O/100 ml), 1.25 ml Carrez-II-solution (7.20 g zinc sulfate, ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O/100 ml) and 2.50 ml NaOH (0.1 mol/l), shake vigorously after each addition, dilute to 25 ml with water, filter (dilution factor F = 2.5). Use the clear sample solution, which may be weakly opalescent, for the assay directly or diluted, if necessary.

Determination of ethanol in alcohol-deficient and alcohol-free beer

Add solid potassium hydroxide or solid sodium hydroxide to approx. 100 ml sample in a beaker while stirring carefully until a pH value of approx. pH 8-9 is obtained. Use solution, diluted according to the dilution table, if necessary, for the assay.

Determination of ethanol in vinegar

Filter, if necessary and neutralize vinegar. Neutralization can be omitted on dilution.

Determination of ethanol in alcoholic beverages

- a) *Wine* (Ref. 14): Dilute wine with redist. water to the appropriate concentration (see dilution table). Decolorization and neutralization are not necessary.
- b) *Beer*: To remove carbonic acid, stir approx. 5-10 ml of beer in a beaker for approx. 30 s using a glass rod or filter. Dilute the sample 1 : 1'000 (1 + 999) with water and use the diluted sample solution for the assay.
- c) *Liqueur*: Pipette liquid liqueurs for dilution into an appropriate volumetric flask and fill up with water to the mark. Weigh approx. 1 g of viscous liqueurs (e.g. egg liqueur) accurately into a 100 ml volumetric flask, fill up to the mark with redist. water, keep it in a refrigerator for separation of fat, and filter. Dilute the clear solution 1 : 100 (1 + 99) with water and use it for the assay.
- d) *Brandy*: Take care as mentioned for taking the sample of alcoholic beverages and dilute to a certain concentration (e.g. 1 + 999). Convert the measured values (g ethanol/l solution) into volume percentage (v/v) with the aid of conversion tables.

1.2. Simplified determination of ethanol in beer, wine (Ref. 14) and brandy

Sample preparation

Dilute beer, wine and brandy according to the dilution table.

Reagent solution for 10 determinations

Dissolve 10 tablets of bottle 2 with 30 ml solution from bottle 1, add 0.5 ml suspension from bottle 3, and mix. (Attention: Prepare reagent solution with alcohol-free water in alcohol-free atmosphere. Store in a container tightly stoppered.)

Stability

The reagent solution is stable for 8 h at 20°C.

Procedure

Pipette 3.00 ml reagent solution into the cuvette and read absorbance A<sub>1</sub>. Start reaction by addition of 0.1 ml diluted sample. On completion of the reaction (approx. 5 min) read absorbance A<sub>2</sub>. Determine absorbance difference of A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub> = ΔA.

Calculation

$$c = \frac{0.714}{\epsilon} \times \Delta A \times F \text{ [g ethanol/l sample]}$$

F = dilution factor

1.3. Pasty foodstuffs

Homogenize semi-solid samples, extract with water or dissolve, respectively, and filter, if necessary. Clarify with Carrez-solutions or decolorize.

Examples:

Determination of ethanol in chocolates, sweets and other alcohol-containing chocolate products

*Chocolates with liquid filling compound (brandy balls, brandy cherries):*  
Open, e.g., one brandy ball carefully, pipette 0.50 ml of the liquid filling into a 50 ml volumetric flask filled with approx. 25 ml water, taking care that the tip of the pipette dips into the water. Fill up to the mark with water, stopper and mix. Dilute the solution with water in a ratio of 1 : 20 (1 + 19). Use 0.1 ml of the diluted solution for the assay (dilution factor F = 2000).

*Chocolate products with highly viscous filling:*

Weigh accurately the filling of one or several sweets or chocolates into a 50 ml volumetric flask filled with approx. 5 ml water (when the sample is weighed by means of a pipette, the tip of the pipette must **not** touch the water surface). Fill up to the mark with water, mix, filter, if necessary, and dilute until the alcohol content of the sample is less than 0.12 g/l.

Determination of ethanol in jam

Homogenize sample thoroughly (mixer, etc.) and weigh approx. 10-20 g into a beaker. Add some water, mix and neutralize the mixture with KOH, if necessary. Transfer the mixture quantitatively into a 100 ml volumetric flask and fill up to the mark with redist. water. Decolorize solution with 2% polyamide or PVPP, if necessary (see "Instructions 1.1.b") and filter. Use the filtrate for the assay undiluted.

Determination of ethanol in honey

Weigh approx. 20 g honey accurately into a 100 ml volumetric flask and dissolve with some water under slightly agitation at approx. 50°C (ascending tube!), cool to room temperature and fill up to the mark with redist. water. Use the solution for the assay, clarify with Carrez-solutions (see „Instructions 1.1.c“), if necessary (dilution factor F=2.5). Use the clear solution for the assay after filtration.



### Determination of ethanol in dairy products (e.g. curds, kefir)

Weigh approx. 10 g of the homogenized sample accurately into a 100 ml volumetric flask, add approx. 50 ml water and keep the flask (ascending tube!) at 50°C for 15 min under slightly agitation. For protein precipitation add 5 ml Carrez-I-solution, 5 ml Carrez-II-solution and 10 ml NaOH (0.1 mol/l) (see "Instructions 1.1.c"), shake vigorously after each addition. Allow to cool to room temperature and fill up to the mark with water. Mix and filter. Use the clear, possibly slightly turbid solution for the assay.

#### 1.4. Solid foodstuffs

Homogenize solid or semi-solid samples (using a mortar, etc.), extract with water or dissolve; filter, if necessary.

Extract fat-containing samples with warm water (approx. 50°C) in a small flask with ascending tube. Allow to cool for separation of fat, rinse the ascending tube with water and filter.

Deproteinize protein-containing sample solutions with perchloric acid (1 mol/l) in a ratio of 1:3 (1+2) and centrifuge. Neutralize with KOH (2 mol/l).

## 2. Specificity

The influence of aldehydes and ketones is eliminated by the order of reagent addition during the assay. Methanol is not converted because of the unfavourable  $K_m$ -values of the used enzymes.

n-Propanol is quantitatively converted under assay conditions, higher primary alcohols lead to sample dependent creep reactions. Secondary, tertiary and aromatic alcohols do not react. Even higher concentrations of glycerol do not disturb the assay.

## 3. Sources of error

The presence of ethanol in the used redist. water or in air results in increased blanks or in creep reactions, respectively. Therefore it is necessary to cover the cuvette during the assay.

### Detection of interferences of the test system

When the enzymatic reaction is complete after the time given in "Procedure" it can be concluded in general that the reaction is not interfered. For assurance of results a re-start of the reaction (qualitatively or quantitatively) by the addition of 'standard material' can be done: a further change of absorbance proves suitability of measurements.

For the detection of gross errors when performing the assays and of interfering substances in the sample material it is recommended to analyze a sample solution in a double determination with two different sample volumes (e.g. 0.10 ml and 0.20 ml): the measured absorbance differences have to be proportional to the sample volumes.

When analyzing solid samples it is recommended to weigh in two different amounts (e.g. 1 g and 2 g) into 100 ml volumetric flasks and to perform the determinations with the same sample volume: the absorbance differences have to be proportional to the amounts weighed in.

## 4. Further applications (s. References)

The method may also be used in the examination of cosmetics, pharmaceuticals, and in research when analyzing biological samples.

For details of sampling, treatment and stability of the sample see Bernt, E. & Gutmann, I. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed. vol. 3, p. 1500, Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, Inc. New York and London.

### Examples:

#### 4.1. Determination of ethanol in blood, plasma or serum, respectively (Ref. 2)

Mix 0.5 ml blood with 4.0 ml ice-cold perchloric acid (0.33 mol/l) and centrifuge. Use 0.1 ml for the assay.

The dilution factor F (depending on sample preparation) is obtained from the sample volume (0.5 ml), the perchloric acid volume (4.0 ml), the specific gravity of the sample material (1.06 g/ml blood, 1.03 g/ml plasma or serum) and the fluid content (0.80 in case of blood and 0.92 in case of plasma or serum):

$$F_{\text{blood}} = \frac{0.5 \times 1.06 \times 0.80 + 4.0}{0.5} = 8.85$$

$$F_{\text{plasma, serum}} = \frac{0.5 \times 1.03 \times 0.92 + 4.0}{0.5} = 8.95$$

### Calculation:

$$c = \frac{0.7256 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \quad [\text{g ethanol/l sample}]$$

$$c = \frac{15.75 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \quad [\text{mmol ethanol/l sample}]$$

### Ethanol in blood:

Wavelength	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
c [g/l]	1.889 x $\Delta A$	1.019 x $\Delta A$	1.039 x $\Delta A$
c [mmol/l]	41.00 x $\Delta A$	22.13 x $\Delta A$	22.55 x $\Delta A$

### Ethanol in plasma or serum, respectively:

Wavelength	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
c [g/l]	1.910 x $\Delta A$	1.031 x $\Delta A$	1.051 x $\Delta A$
c [mmol/l]	41.46 x $\Delta A$	22.38 x $\Delta A$	22.81 x $\Delta A$

## 4.2. Determination of ethanol in urine (Ref. 12)

Dilute urine with bidest. water according to the dilution table. Use the diluted sample for the assay (dilution factor = F).

### Calculation:

$$c = \frac{0.7256 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \quad [\text{g ethanol/l sample}]$$

$$c = \frac{15.75 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \quad [\text{mmol ethanol/l sample}]$$

Wavelength	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
c [g/l]	0.2134 x $\Delta A \times F$	0.1152 x $\Delta A \times F$	0.1174 x $\Delta A \times F$
c [mmol/l]	4.632 x $\Delta A \times F$	2.500 x $\Delta A \times F$	2.549 x $\Delta A \times F$

## 4.3. Determination of ethanol in fermentation samples and cell culture media

Place the sample (after centrifugation, if necessary) into a water-bath at 80°C for 15 min (cover the tube because of the volatility of ethanol) to stop enzymatic reactions. Centrifuge and use the supernatant (diluted according to the dilution table, if necessary) for the assay. Alternatively, deproteinization can be carried out with perchloric acid or with Carrez-solutions. See the above-mentioned examples.

Homogenize gelatinous agar media with water and treat further as described.

## 5. Technical instructions

1. Ethanol is very volatile. Therefore it is necessary to be very careful when handling ethanol containing samples, diluting samples and pipetting sample solutions into the assay system.

When filtering solutions the filtrate should not drop into the container but rinse down the wall.

When dispensing ethanol containing solutions, always pipette these solutions under the surface of water (when diluting) or of buffer (when performing the assay).

2. When pipetting highly diluted sample solutions into the assay system, rinse measuring glass pipet (enzyme test pipet) at least 5 times. The tip of the piston type pipet should be rinsed 3 times.

3. Do not use the same piston type pipet for diluting the sample and pipetting the sample solution into the assay system.

4. Always work in alcohol-free atmosphere with ethanol-free water.

## References

- Beutler, H.-O. & Michal, G. (1977) Neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Athanol in Lebensmitteln, *Z. Anal. Chem.* **284**, 113-117.
- Beutler, H.-O. (1984) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 598-606, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- Schweizerisches Lebensmittelbuch (1981) Kapitel 61B/2.1.
- Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **77**, 8.
- Bücher, T. & Redetzki, H. (1951) Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege, *Klinische Wochenschrift* **29**, 615-616.
- Tanner, H. & Brunner, E. M. (1965) Zur Bestimmung des in alkoholfreien Getränken und in Aromadestillaten enthaltenen Äthylalkohols, *Mitt. Gebiete Lebensm. Unters. u. Hyg.* **56**, 480-487.
- Quast, P. (1978) Weitere Notwendigkeiten und Möglichkeiten der Fruchtanalyse beim Apfel, *Mitt. Obstbauversuchsring des Alten Landes* **9**, 293-301.
- Henniger, G. & Boos, H. (1978) Anwendung der enzymatischen Analyse bei der Untersuchung kosmetischer Präparate - dargestellt an einigen Beispielen, *Seifen - Öle - Fette - Wachse* **104**, 159-164.
- Henniger, G. & Pösch, H. (1981) Enzymatische Substratbestimmungen in der pharmazeutischen Analytik, dargestellt an den Bestimmungen von L-Ascorbinsäure, Äthanol und Lactose, *Deutsche Apotheker Zeitung* **121**, 643-649.

10 Kohler, P. (1982) Enzymatische Ethanol-Bestimmung in Glace- und Schokolade-  
produkten, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **73**, 44–49.

11 Jung, G. & Féraud, G. (1978) Enzyme-coupled measurement of ethanol in whole  
blood and plasma with a centrifugal analyzer, Clin. Chem. **24**, 873–876.

12 Beutler, H.-O. (1985) unpublished results.

13 Pfandl, A. & Menschig, D. (1984) Ein Beitrag zur enzymatischen Glycerin- und  
Ethanolbestimmung, Pharm. Ind. **46**, 403–407.

14 Die Methode ist zugelassen bei der Untersuchung von Wein im Rahmen der

Qualitätsweinprüfung in Rheinland-Pfalz (1985; Landwirtschaftskammer Bad  
Kreuznach) und in Hessen (1986; Ministerium für Landwirtschaft und Forsten).  
The use of the method is admitted for the investigation of wine within quality  
wine examination in Rheinland-Pfalz (1985; Landwirtschaftskammer Bad Kreuz-  
nach) and in Hessen (1986; Ministerium für Landwirtschaft und Forsten).

15 Buckee, G. K. & Baker, C. D. (1986) Enzymatic Determination of Ethanol in  
Alcohol-Free and Low Alcohol Beers, Monatsschrift für Brauwissenschaft **39**,  
257–259.

# Ethanol standard solution

for the Test-Combination Ethanol  
UV-method, Cat. No. 176 290

**Concentration\*:** see bottle label.  
Ethanol standard solution is a stabilized aqueous solution of ethanol.  
It serves as standard solution for the enzymatic analysis of ethanol  
in foodstuffs and other materials.

**Application**  
1. *Addition of ethanol standard solution to the assay mixture:*  
Instead of sample solution the standard solution is used for the assay.

2. *Restart of the reaction, quantitatively:*  
After completion of the reaction with sample solution and measuring of A<sub>2</sub>,  
add 0.05 ml standard solution to the assay mixture. Read absorbance A<sub>3</sub>  
after the end of the reaction (approx. 5 min). Calculate the concentration  
from the difference of (A<sub>3</sub>–A<sub>2</sub>) according to the general equation for cal-  
culating the concentration. The altered total volume must be taken into  
account. Because of the dilution of the assay mixture by addition of the  
standard solution, the result differs insignificantly from the data stated on  
the bottle label.

3. *Internal standard*  
The standard solution can be used as an internal standard in order to  
check the determination for correct performance (gross errors) and to see  
whether the sample solution is free from interfering substances:

Pipette into cuvettes	blank	sample	standard	sample + standard
reaction mixture 2	3.00 ml	3.00 ml	3.00 ml	3.00 ml
redist. water	0.10 ml	–	–	–
sample solution	–	0.10 ml	–	0.05 ml
standard solution	–	–	0.10 ml	0.05 ml

mix, and read absorbances of the solutions (A<sub>i</sub>) after approx. 3 min.  
Continue as described in the pipetting scheme under "Procedure".  
Follow the instructions given under "Instructions for performance of  
assay" and the footnotes.

The recovery of the standard is calculated according to the following  
formula:

$$\text{recovery} = \frac{2 \times \Delta A_{\text{sample + standard}} - \Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times 100 \text{ [\%]}$$



Cont.Nr.	Monst		HeUit- koslag	Bruinkleuring				Cijf	
	no	Cond		0	1	2	3		
37	1	0-21	1	1	1	3	4	2.37	
	2		2	1	6	4	2	1.66	
	3		1	2		1	7	2.87	
	4		2	2			12	3	
38	5	5-21	1	1	8			1	
	6		2	1	8	2	1	0.36	
	7		1	2		1	3	4	2.37
	8		2	2			10	2	2.16
39	9	5-21	1	1	2	4	2		1
	10		2	1	5	7			0.58
	11		1	2			8		2
	12		2	2			3	9	2.75
40	13	0-21	1	1		5	3		1.37
	14		2	1		10	2		1.16
	15		1	2				8	3
	16		2	2				12	3
41	17	10-21	1	1	7	1			0.12
	18		2	1	6	4	2		0.66
	19		1	2			4	4	2.5
	20		2	2			11	1	2.08
42	21	20-21	1	1	5	2	1		0.5
	22		2	1	9	3			0.25
	23		1	2	2	2	3	1	1.37
	24		2	2		11		1	1.16
43	25	10-21	1	1	2	5	1		0.87
	26		2	1	10	2			0.16
	27		1	2		1	2	5	2.5
	28		2	2		2	6	4	2.16
44	29	20-21	1	1	6	2			0.25
	30		2	1	11	1			0.08
	31		1	2			1	7	2.87
	32		2	2			3	9	2.75
45	33	0-1	1	1		2	6		1.75
	34		2	1		5	7		1.58
	35		1	2				8	3
	36		2	2				12	3

46	37	0-1	1	1		5	3		1.37
	38		2	1	1	11			0.91
	39		1	2				8	3
	40		2	2				12	3
47	41	0-1	1	1		2	6		1.75
	42		2	1		9	3		1.25
	43		1	2				8	3
	44		2	2				12	3
48	45	0-1	1	1		6	2		1.25
	46		2	1			12		2
	47		1	2				8	3
	48		2	2				12	3

Cont.Nr.	Monst no	Cond	HeUt-koslag	0	1	2	3	Dijf
37	1	0-21	1 1	8				0
	2		2 1	7	4		1	0.583
	3		1 2				8	3
	4		2 2				12	3
38	5	5-21	1 1	8				0
	6		2 1	10		1		0.181
	7		1 2			6	2	2.25
	8		2 2			6	6	2.5
39	9	5-21	1 1	8				0
	10		2 1	12				0
	11		1 2			1	7	2.675
	12		2 2			4	8	2.666
40	13	0-21	1 1	8				0
	14		2 1	12				0
	15		1 2				8	3
	16		2 2			5	7	2.583
41	17	10-21	1 1	8				0
	18		2 1	12				0
	19		1 2		1	7		1.875
	20		2 2			5	7	2.583
42	21	20-21	1 1	8				0
	22		2 1	12				0
	23		1 2		2	5	1	1.875
	24		2 2				12	3
43	25	10-21	1 1	8				0
	26		2 1	12				0
	27		1 2			1	7	2.875
	28		2 2			3	9	2.75
44	29	20-21	1 1	8				0
	30		2 1	12				0
	31		1 2			2	6	2.75
	32		2 2				12	3
45	33	0-1	1 1	8				0
	34		2 1	10		2	6	1.222

	35		1 2			6	6	2.5
	36		2 2					ERR
46	37	0-2	1 1	8				0
	38		2 1	11	1			0.083
	39		1 2			2	6	2.75
	40		2 2				12	3
47	41	0-2	1 1	8				0
	42		2 1	10	2			0.166
	43		1 2			3	5	2.625
	44		2 2			1	11	2.916
48	45	0-1	1 1	8				0
	46		2 1	12				0
	47		1 2				3	0

Cont.Nr.	Monst no	Cond	HeUit-koslag	Koprot Ja	Koprot Nee	Koprot (%)
37	1	0-21	1	1		
	2		2	1		
	3		1	2	7	87.5
	4		2	2	6	50
38	5	5-21	1	1		
	6		2	1		
	7		1	2	8	0
	8		2	2	8	66.6
39	9	5-21	1	1		
	10		2	1		
	11		1	2	5	62.5
	12		2	2	2	16.6
40	13	0-21	1	1		
	14		2	1		
	15		1	2	2	25
	16		2	2	8	66.6
41	17	10-21	1	1		
	18		2	1		
	19		1	2	2	25
	20		2	2	3	25
42	21	20-21	1	1		
	22		2	1		
	23		1	2	5	62.5
	24		2	2	3	25
43	25	10-21	1	1		
	26		2	1		
	27		1	2	4	50
	28		2	2	8	66.6
44	29	20-21	1	1		
	30		2	1		
	31		1	2	6	75
	32		2	2	10	83.3
45	33	0-1	1	1		

46	34		2	1		
	35		1	2	4	50
	36		2	2	6	50
	37	0-1	1	1		
47	38		2	1		
	39		1	2	5	62.5
	40		2	2	6	50
	41	0-1	1	1		
48	42		2	1		
	43		1	2	5	62.5
	44		2	2	7	58.3
	45	0-1	1	1		
49	46		2	1		
	47		1	2		

Cont.Nr.	Monst no	Cond	HeUit-koslag	Roodkleuring				Dijf
				0	1	2	3	
37	1	0-21	1 1	8				0
	2		2 1	12				0
	3		1 2	8				0
	4		2 2	12				0
38	5	5-21	1 1	8				0
	6		2 1	12				0
	7		1 2	8				0
	8		2 2	12				0
39	9	5-21	1 1	5	3			0.375
	10		2 1	5	7			0.583
	11		1 2	8				0
	12		2 2	10			2	0.5
40	13	0-21	1 1	7	1			0.125
	14		2 1	2	5	5		1.25
	15		1 2	3	5			0.625
	16		2 2	1	4	3	4	1.833
41	17	10-21	1 1	8				0
	18		2 1	12				0
	19		1 2	8				0
	20		2 2	12				0
42	21	20-21	1 1	7	1			0.125
	22		2 1	10	2			0.166
	23		1 2	8				0
	24		2 2	11	1			0.083
43	25	10-21	1 1	8				0
	26		2 1	6	6			0.5
	27		1 2	8				0
	28		2 2	12				0
44	29	20-21	1 1	7	1			0.125
	30		2 1	9	3			0.25
	31		1 2	8				0
	32		2 2	10	1		1	0.333
45	33	0-1	1 1	1	2	5		1.5
	34		2 1	4	6	2		0.833
	35		1 2		3	2	3	2

46	36		2 2		4	3	5	2.083
	37	0-1	1 1	3	5			0.625
	38		2 1	3	5	4		1.083
	39		1 2		3	2	3	2
	40		2 2	1	8	2	1	1.25
47	41	0-1	1 1	4	1	3		0.875
	42		2 1	8	2	2		0.5
	43		1 2	4	3	1		0.625
	44		2 2		4	3	5	2.083
48	45	0-1	1 1	6	2			0.25
	46		2 1	12				0
	47		1 2					0

Cont	HerCond.		Uitslag		Uitslag	
	komCO2 - 02		Gewicht	Gew. voor	Gew.	
			Diepvries	Rapidase	vezels	Verol%
37	1	0-21	391.28	328.32	0.9235	0.2812
	2		389.64	245.83	0.4967	0.2020
38	1	5-21	613.44	296.52	0.7071	0.2384
	2		386.59	245.6	0.3431	0.1396
39	1	5-21	550.22	260.54	0.791	0.3036
	2		379.9	245.96	0.5615	0.2262
40	1	0-21	386.32	283.61	0.5632	0.1985
	2		428.23	267.50	0.6315	0.2352
41	1	10-21	557	272.74	0.3433	0.1258
	2		374.13	278.82	0.3237	0.1414
42	1	20-21	579.73	287.01	0.3202	0.1115
	2		419.72	245.98	0.4131	0.1679
43	1	10-21	537.75	260.48	0.4065	0.1500
	2		374.35	253.03	0.4542	0.1795
44	1	20-21	445.22	251.63	0.5752	0.2580
	2		423.62	265.26	0.4539	0.1591
45	1	0-1	558.69	275.62	0.659	0.3115
	2		542.38	261.19	0.9797	0.3745
46	1	0-2	512.98	237.01	0.7395	0.2277
	2		490.56	249.51	0.2102	0.3247
47	1	0-2	611.12	288.77	0.8039	0.2367
	2		520.78	260.39	0.7627	0.1929
48	1	0-1	502.43	276.31	0.5554	0.2010
	2		541.65	255.94	0.4504	0.1732
H1-s	1				272.24	0.376 0.158
H2-s	2				240.26	0.397 0.165